

琼脂糖酶产生菌 *Brevundimonas* sp. 发酵条件探讨

赵蓉蓉, 陈雪婷, 桑卫国*, 章宗铭

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为研究微生物发酵法获取高产量、高活性的琼脂糖酶, 以海洋细菌 *Brevundimonas* sp. 为实验菌株, 首先采用单因子分析法对发酵条件进行初步研究, 然后用部分析因试验设计方法选出 2 个显著因子热休克时间和发酵时间, 用中心组合设计方法进行试验设计及其发酵条件优化, 最后建立二次响应面回归模型. 从该模型可获得适宜发酵条件: 接种量 1.5%, 热休克时间 31 s, 初始 pH 7.5, 摇床转速 120 r·min⁻¹, 发酵时间 28.4 h, 发酵温度 23.5 °C. 发酵条件优化后可产最大酶活 502.2 U·mL⁻¹, 产酶活力较优化前提高了 35%.

关键词: 琼脂糖酶; 单因子; 中心组合; 响应面

中图分类号: Q815

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2014) 01-0013-05

琼脂经琼脂糖酶降解得到的产物琼脂寡糖具有抗癌、抗氧化、抗病毒等众多生理活性, 被广泛地运用于医药领域^[1-3]. 琼脂是某些红藻细胞壁的重要组成部分, 因此, 琼脂糖酶在这些海藻的单细胞分离、酶解破壁制备原生质体等过程中具有重要的使用价值. 琼脂糖酶也可用于海藻多糖的结构研究, 用琼脂糖酶水解某些海藻的多糖, 测定其水解产物的结构, 进而推测多糖的结构, 是行之有效的方法^[4]. 琼脂糖酶主要来源于海洋软体动物和海洋微生物. 据有关文献报道^[5-7], 弧菌(*Vibrio* sp.)、交替假单胞菌属(*Pseudoalteromonas* sp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)等中的某些菌种均能分解琼脂. 国内在琼脂微生物降解和琼脂糖酶解方面的研究报道仅局限于实验室研究, 尚无产业化应用^[8-10].

菌种、发酵条件、培养基、分离提纯技术均会影响琼脂糖酶产量和活力. 本文报道了一株海域腐烂紫菜中分离到一株产琼脂糖酶的海洋细菌 *Brevundimonas* sp. 的适宜产酶发酵条件, 以提高菌株的产酶活力为目的, 确定了该琼脂降解菌的最适发酵条件, 为微生物工业化生产琼脂糖酶产品提供一定的基础.

1 材料与方法

1.1 菌株

从紫菜养殖场中的腐烂紫菜筛选出海洋细菌 *Brevundimonas* sp., 该菌株由本实验室保存.

1.2 培养基及试剂

试剂: DNS 试剂^[11]; 固体培养基: 琼脂 15 g·L⁻¹, NaCl 25 g·L⁻¹, 蛋白胨 5 g·L⁻¹, 酵母膏 10 g·L⁻¹, FeSO₄·7H₂O 0.1 g·L⁻¹, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.5.

液体种子培养基: 琼脂 2 g·L⁻¹, NaCl 2 g·L⁻¹, 蛋白胨 5 g·L⁻¹, 酵母膏 10 g·L⁻¹, FeSO₄·7H₂O 0.1 g·L⁻¹, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.5.

发酵培养基成分(w/v): 琼脂粉 0.536%, NaCl 2.5%, FePO₄ 0.1%, CaCl₂ 0.052%, K₂HPO₄ 0.1%, FeSO₄·7H₂O 0.03%, 酵母膏 1%, 蛋白胨 0.484%.

1.3 发酵条件

培养温度定为 23 °C; 起始 pH 7.5; 500 mL 三角瓶装液量为 150 mL; 热休克时间 0 s; 发酵时间为 28 h, 摇床转速为 120 r·min⁻¹.

1.4 琼脂糖酶活力测定

按 DNS 法进行^[11].

收稿日期: 2013-04-21.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(40776077); 农业部水产种质资源与养殖生态重点实验室开放实验室科研项目(KFT2006.2).

第一作者: 赵蓉蓉(1988-), 女, 浙江金华人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 生物工程与技术. E-mail: 247309442@qq.com

*通信作者: 桑卫国(1955-), 男, 浙江宁波人, 副教授, 主要研究方向: 活性物质制备与分析. E-mail: sangweigu@nbu.edu.cn

1.5 单因子实验设计

按 1.2 节所述的发酵培养基成分, 1.3 节中的初始发酵条件下发酵, 分别考察各成分含量对琼脂酶发酵产酶活力的影响, 确定各成分在培养基中的最佳含量。

1.6 发酵条件优化方法

根据 SAS 8.2 软件的筛选试验设计方法, 进行多因子两水平的试验设计, 分析各因子的效应并筛选出显著因子; 然后采用分式析因设计方法(fractional factorial)进行实验设计; 最后运用 SAS 8.2 软件的二次响应面回归(RSREG)程序对实验点的响应值进行回归分析, 并建立回归模型, 从而确定发酵条件的适宜配方。

1.7 实验数据处理

实验采用 SAS 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 统计分析软件对数据进行处理。

2 结果与讨论

2.1 单因子实验设计

通过分别对发酵条件中的接种量、热休克、初始 pH、摇床转速、发酵时间和发酵温度进行单因

子实验, 确定了因子的水平范围, 结果如图 1 所示。从图 1 可知, 发酵条件为: 接种量 1.5%、热休克 30 s、初始 pH 7.5、摇床转速 120 r·min⁻¹、发酵时间 28 h 及发酵温度 23.5 °C 时效果较佳。将此定为多因子两水平的部分析因设计的中心点^[12]。

2.2 部分析因试验设计及其两水平分析

根据 SAS 8.2 软件的筛选试验设计方法, 对发酵条件进行了多因子两水平的试验设计, 该设计方法的优越性是用较少试验次数达到各因子的效应得到尽可能精确的估计, 适用于从众多的考察因子中快速有效地筛选出最为重要的几个因子, 供进一步研究^[13]。每个因素取 2 个水平: 低水平为原始培养条件, 高水平约取低水平的 1.25 倍。但是对某个因素高低水平的差值不能过大, 以防掩盖了其他因素的重要性, 应依实验条件而定。用 1 表示高水平, -1 表示低水平。定义 X_1 为接种量, X_2 为热休克时间, X_3 为初始 pH, X_4 为摇床转速, X_5 为发酵时间, X_6 为发酵温度, Y_1 为酶活的响应值。表 1 为 6 因素用部分析因设计方法中的 1/8 Fraction 设计出的试验以及相对应的响应值(Y_1)。表 2 是 Y_1 的方差分析, 通过 $P < 0.05$ 而选出有显著性差异的两因素

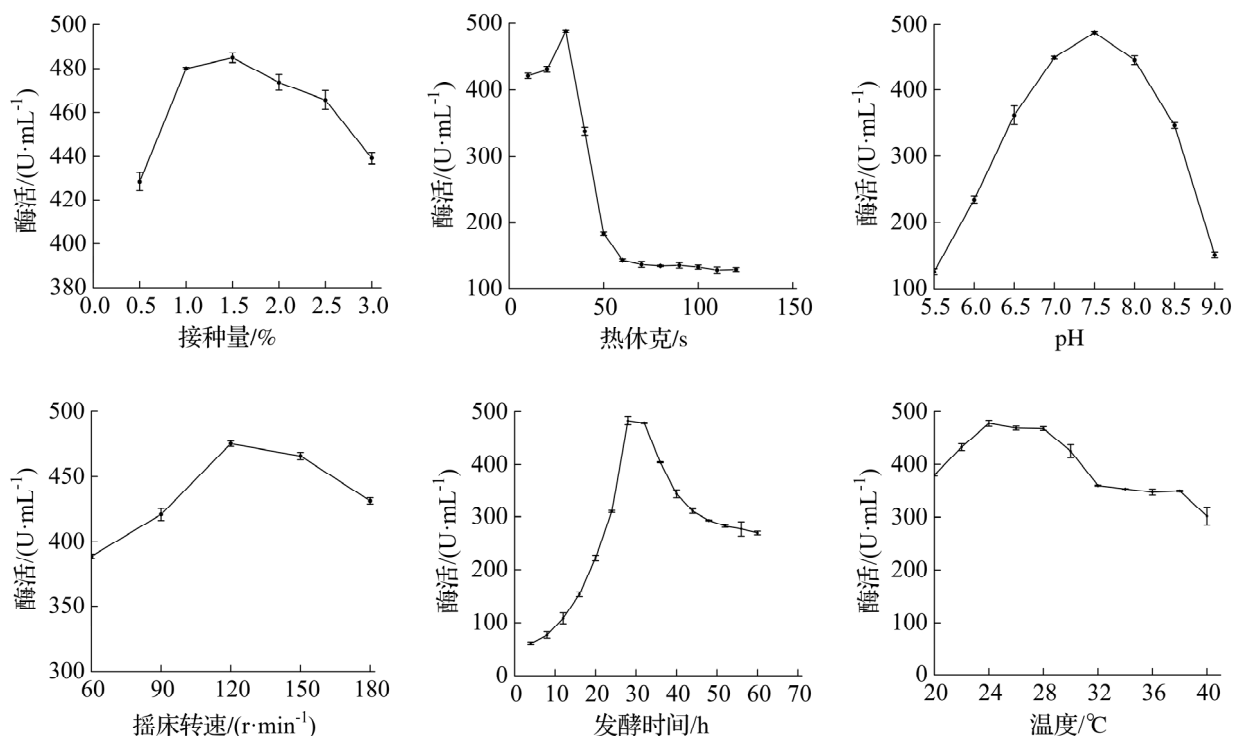


图 1 发酵条件对琼脂糖酶产量的影响

X_2, X_5 作响应面分析^[14].

表 1 分式析因试验设计发酵条件的因子和响应值

试验号	因子						$Y_1/(\text{U}\cdot\text{mL}^{-1})$
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	
1	-1	-1	-1	1	1	1	418.7
2	1	-1	-1	-1	-1	1	445.6
3	-1	1	-1	-1	1	-1	463.5
4	1	1	-1	1	-1	-1	494.7
5	-1	-1	1	1	-1	-1	446.2
6	1	-1	1	-1	1	-1	417.4
7	-1	1	1	-1	-1	1	495.2
8	1	1	1	1	1	1	416.8

表 2 响应值的方差分析

来源	自由度	离差平方和	均方	F	$Pr>F$
X_1	1	2.10125	2.10125	0.212221	0.725174
X_2	1	4385.161	4385.161	442.8897	0.030228
X_3	1	0.45125	0.45125	0.045575	0.866102
X_4	1	0.01125	0.01125	0.001136	0.978549
X_5	1	1809.011	1809.011	182.7053	0.047013
X_6	1	0.03125	0.03125	0.003156	0.964272
模型	6	6196.768	1032.795	104.3095	0.074809
误差	1	9.90125	9.90125		
总变异	7	6206.669			

2.3 响应面分析试验

具有显著性差异的两因子 X_2, X_5 用中心组合设计法设计试验, 设计成两因子五水平. 表 3 是两因子的编码及取值, 表 4 是试验设计及其响应值.

表 3 发酵条件显著因子水平

因子	编码值				
	-1.41421	-1	0	1	1.41421
X_2	27.2	28	30	32	32.8
X_5	25.2	26	28	30	30.8

表 4 发酵条件关于中心组合试验设计与结果

运行	X_2	X_5	观察值
1	-1.00000	-1.00000	470.3
2	-1.00000	1.00000	475.1
3	1.00000	-1.00000	477.2
4	1.00000	1.00000	494.4
5	-1.41421	0.00000	475.7
6	1.41421	0.00000	501.6

续表

运行	X_2	X_5	观察值
7	0.00000	-1.41421	476.2
8	0.00000	1.41421	481.2
9	0.00000	0.00000	498.6
10	0.00000	0.00000	499.2
11	0.00000	0.00000	498.7
12	0.00000	0.00000	499.2
13	0.00000	0.00000	499.3

根据表 4, 在 SAS 8.2 软件中运用二次响应面回归(RSREG)程序结合响应面分析得表 5~表 8 以及图 2.

表 5 响应值统计的吻合度

项目	母型	预测模型
平均值	488.2077	488.2077
变量间相关程度值/%	95.41	95.41
调整后变量相关程度值/%	92.12	92.12
均方根误差	3.402359	3.402359
变异系数	0.696908	0.696908

表 5 是关于模型吻合度的分析, R-Square 为 0.9541, 表明分析方程回归拟合度很高.

表 6 发酵主要因素拟合方程各参数及其系数

参数	自由度	估计值	标准误差	T 值	$Pr> t $	估值
截距	1	499.000005	1.521581	327.95	<0.0001	499.000028
X_2	1	7.853534	1.202916	6.53	0.0003	11.106535
X_5	1	3.633910	1.202916	3.02	0.0194	5.139064
X_2^2	1	-6.281260	1.289985	-4.87	0.0018	-12.562492
X_2X_5	1	3.100000	1.701180	1.82	0.1112	6.199986
X_5^2	1	-11.256273	1.289985	-8.73	<0.0001	-22.512496

表 6 是关于拟合方程各参数及其系数值, 由此可得出适应方程模型:

$$Y_1=499+7.853534X_2+3.63391X_5-6.28126X_2^2+3.1X_2X_5-11.25627X_5^2.$$

Pr 为各参数对方程贡献的大小, 从表 6 可看出除 X_2X_5 外, 其他参数对方程均有显著作用.

表 7 主要发酵因素拟合方程的极值评估

因子	编码值
X_2	0.486757
X_5	0.181165

表 7 是通过响应面分析得到拟合方程后, 计算

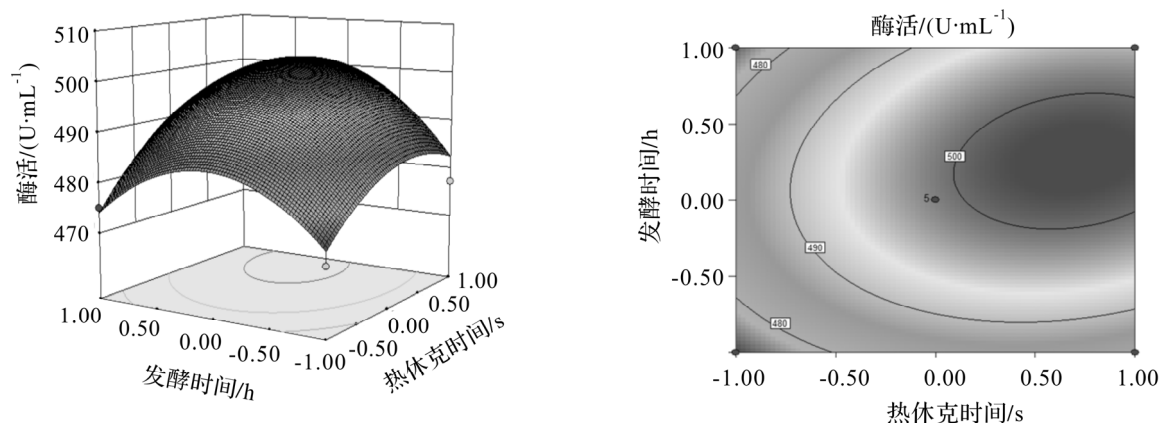


图2 产琼脂糖酶菌株对应2个主要发酵条件的响应值的响应面及等高线

出编码值在 $X_2=0.486757$, $X_5=0.181165$ 时可取得最大值 502.168627.

表8 主要发酵因素拟合方程的特征值

特征值	X_2	X_5
-11.675702	0.961436	0.275030
-23.399286	-0.275030	0.961436

表8是对拟合方程特征值的分析,表8中2个特征值均为负值,说明最大值是一稳定点.经过换算可得 $X_2=31$ s, $X_5=28.4$ h.其他4个通过单因素优化得到的最优水平为:接种量 1.5%、初始 pH 7.5、摇床转速 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、发酵温度 23.5°C .

从图2可以直观地看出最大值是一稳定点,从而进一步强化了 RSREG 分析后得出编码值在 $X_2=0.486757$, $X_5=0.181165$ 时可取得最大值 502.168627 这一结论.

将上述配方用于多次重复试验,得到的平均酶活为 $501.9 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,与计算出的数据较吻合.

3 结论

琼脂糖酶在海洋生物活性物质开发和治疗疑难病症方面均有重要作用,并已日益引起国内外学者的重视^[15-17].实验证明,在单因子实验基础上应用 SAS 8.2 软件进行实验设计,以琼脂糖酶产生菌 *Brevundimonas* sp. 为实验菌株,采用优化后的发酵条件:接种量 1.5%,热休克 31 s,初始 pH 7.5,摇床转速 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,发酵时间 28.4 h,发酵温度 23.5°C ,菌种产酶活力可高达 $501.9 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$.分别是朱启忠等^[4]优化酶活力 $56.89 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 8.8 倍,王静雪等^[18]实验结果 $332 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 1.5 倍,表明该

菌株的开发前景良好.本实验结果对于今后利用该菌株工业化生产琼脂糖酶不仅提供较为有用的技术指导,而且可节省生产成本.

参考文献:

- [1] 唐中秀. 琼胶酶的制备、分离纯化及酶学性质研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2012.
- [2] 黄建艳, 包磊, 毛萱, 等. 琼脂糖-透明质酸共聚物作为胰岛素载体[J]. 材料科学与工程学报, 2009, 27(1): 43-46.
- [3] 贾栋, 高国栋, 李永林. 壳聚糖纳米粒载体转染铜超氧化物歧化酶对缺血再灌注脑组织的作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(45):8827-8830.
- [4] 朱启忠, 朱慧文, 孙艳娜, 等. 海洋细菌 NBRC10260 产琼脂糖酶发酵条件优化[J]. 中国酿造, 2011, 5:53-55.
- [5] 马翠萍, 石超. 琼脂糖酶研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 35(1):107-111.
- [6] Romanenko L A, Zhukova N V, Rohde M, et al. Agarase: Review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications[J]. Marine Drugs, 2010, 8(1):200-218.
- [7] Ravichand J, Sanjeev C G. Purification and characterization of β -agarase from seaweed decomposing bacterium *Microbulbifer* sp. strain CMC-5[J]. Bio-technology and Bioprocess Engineering, 2011, 16:513-519.
- [8] 解卉, 韩宝芹, 董文, 等. 一种海洋琼脂糖酶的分离纯化、酶学性质研究及降解产物分析[J]. 微生物学报, 2009, 7:896-901.
- [9] 王静雪, 江晓路. 细菌降解琼胶的研究进展[J]. 中国水产科学, 2001, 8(3):94-96.
- [10] 朱启忠, 朱慧文, 孙艳娜, 等. 壳聚糖固定化琼脂酶的

- 研究[J]. 生物加工过程, 2011, 35(1):107-111.
- [11] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars[J]. Anal Chem, 1959, 31:426-428.
- [12] 褚以文. 微生物培养基优化方法及其 OPTI 优化软件[J]. 国外医药抗生素分册, 1999, 20(2):58-61.
- [13] 胡运权. 试验设计方法[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 1997.
- [14] Konya A. Optimization of compact in fermentation[J]. J Industrial Microbiology & Biotechnology, 1998(20):150-152.
- [15] 管斌, 倪雪鹏, 李悦明, 等. 海藻多糖降解酶的研究进展[J]. 中国酿造, 2010(9):8-12.
- [16] 周雁胜, 王保莉, 曲东, 等. β -琼脂糖酶 I DagA 的原核表达和活性鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(1):132-137.
- [17] 王祥红, 贾仁洁, 张超, 等. 产琼胶酶海洋细菌的分离、鉴定及其分解琼胶实验[J]. 生物学通报, 2011, 46(5):50-51.
- [18] 王静雪, 江晓路, 牟海津, 等. 海洋弧菌 QJH-12 发酵产琼脂糖酶条件的优化[J]. 中国酿造, 2007, 31(7):8-12.

Fermentation Conditions of Strain *Brevundimonas* sp. Producing Agarase

ZHAO Rong-rong, CHEN Xue-ting, SANG Wei-guo*, ZHANG Zong-ming
(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: To obtain high yields and high activeness of agarase, marine bacteria strain *Brevundimonas* sp. agarase-producing is selected to study the optimal fermentation conditions. Using single factor analysis of the fermentation conditions for a preliminary study, fractional factorial design is used to select two significant factors of heat shock time and fermentation time, the central composite design is adopted in experimental design and optimization of the fermentation conditions. Then quadratic response surface regression model is established. The optimal fermentation condition is obtained from the following model: Inoculation of 1.5%; heat shock time 31 s; initial pH 7.5; rotation speed $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$; fermentation time 28.4 h; fermentation temperature 23.5°C . The highest activity of agarase is $502.2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ under the optimal fermentation conditions, which is 1.35 times as high as that under the original conditions. This study is expected to provide some technical guidance for future application of the microbial strain in commercialization of the agarase.

Key words: agarase; single factor; central composite; response surface

(责任编辑 史小丽)